

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR05/000472

International filing date: 22 February 2005 (22.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

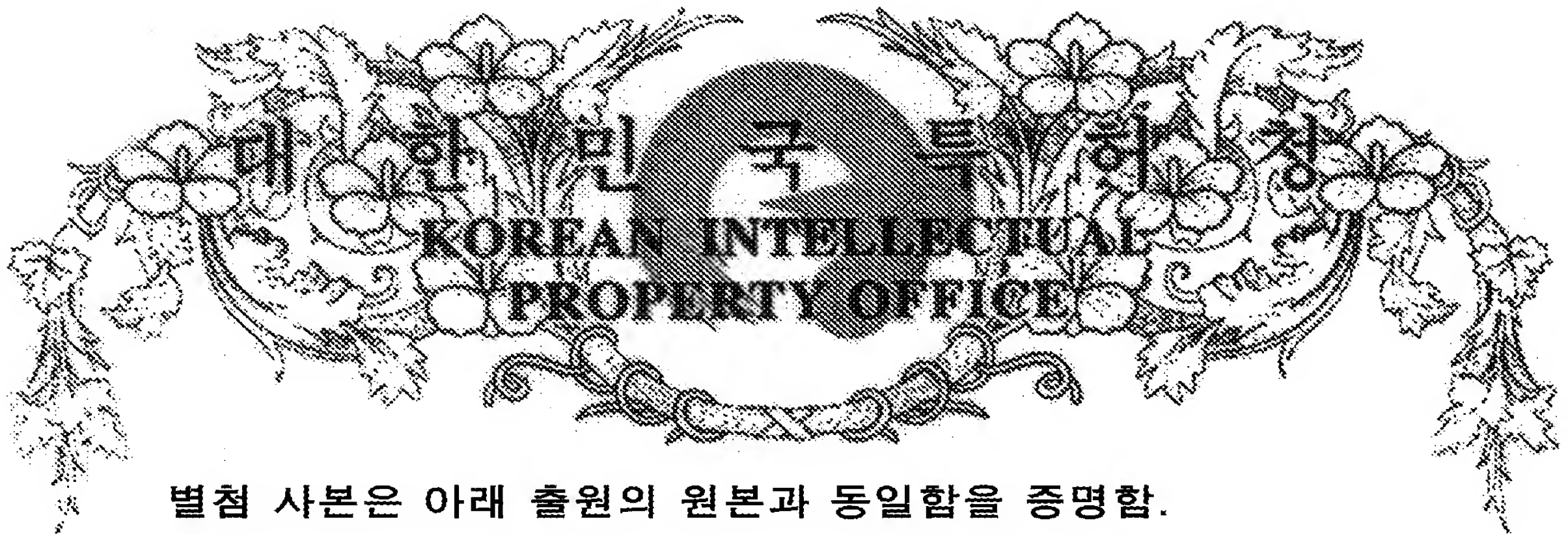
Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2004-0014236
Filing date: 03 March 2004 (03.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 17 May 2005 (17.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office

출원번호 : 특허출원 2004년 제 0014236 호
Application Number 10-2004-0014236

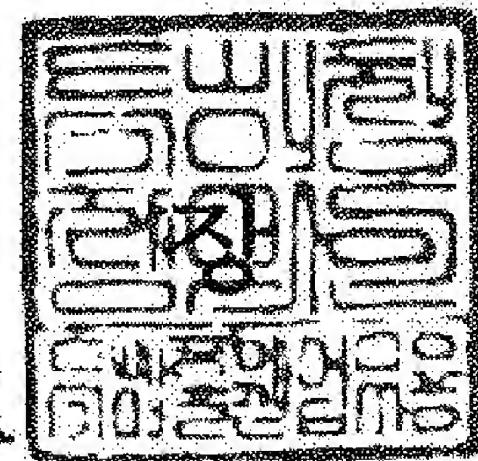
출원일자 : 2004년 03월 03일
Date of Application MAR 03, 2004

출원인 : 한국생명공학연구원
Applicant(s) Korea Research Institute of Bioscience and
Biotechnology

2005 년 04 월 07 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.03.03
【발명의 국문명칭】	비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디터페노이드계 화합물을 유효성분으로 하는 심장순환계 질환의 예방 및 치료용 조성물
【발명의 영문명칭】	Composition comprising extract of Torreya nucifera or abietane diterpenoid compounds isolated from them for prevention and treatment of cardiovascular disease
【출원인】	
【명칭】	한국생명공학연구원
【출원인코드】	3-1999-034166-5
【대리인】	
【성명】	이원희
【대리인코드】	9-1998-000385-9
【포괄위임등록번호】	2002-029927-3
【발명자】	
【성명의 국문표기】	정태숙
【성명의 영문표기】	JEONG, Tae-Sook
【주민등록번호】	580117-2026112
【우편번호】	302-120
【주소】	대전광역시 서구 둔산동 957번지 파랑새 아파트 101-1101
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이우송

【성명의 영문표기】	LEE, Woo-Song
【주민등록번호】	640302-1923816
【우편번호】	305-755
【주소】	대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 125-1504
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	조경현
【성명의 영문표기】	CH0, Kyung-Hyun
【주민등록번호】	680720-1927225
【우편번호】	305-340
【주소】	대전광역시 유성구 도룡동 과기원아파트 2-305
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김형진
【성명의 영문표기】	KIM, Hyoung-Chin
【주민등록번호】	590108-1017713
【우편번호】	305-335
【주소】	대전광역시 유성구 궁동 431-14 301호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	최양규
【성명의 영문표기】	CH0I, Yang-Kyu
【주민등록번호】	670429-1631613
【우편번호】	305-755
【주소】	대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 129-1307
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김주령

【성명의 영문표기】	KIM, Ju-Ryoung		
【주민등록번호】	750205-2551716		
【우편번호】	429-802		
【주소】	경기도 시흥시 군자동 137번지		
【국적】	KR		
【발명자】			
【성명의 국문표기】	안소진		
【성명의 영문표기】	AN, So-Jin		
【주민등록번호】	760112-2716217		
【우편번호】	305-805		
【주소】	대전광역시 유성구 신성동 210-59 엘림빌라 202호		
【국적】	KR		
【발명자】			
【성명의 국문표기】	김경순		
【성명의 영문표기】	KIM, Kyung-Soon		
【주민등록번호】	800715-2463112		
【우편번호】	301-142		
【주소】	대전광역시 중구 유천2동 203-28		
【국적】	KR		
【심사청구】	청구		
【취지】	<p>특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인</p> <p>이원희 (인)</p>		
【수수료】			
【기본출원료】	35 면	38,000 원	
【가산출원료】	0 면	0 원	
【우선권주장료】	0 건	0 원	

【심사청구료】	6 항	301,000 원
【합계】		339,000 원
【감면사유】	정부출연연구기관	
【감면후 수수료】		169,500 원

【요약서】

【요약】

본 발명은 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디터페노이드계 화합물을 유효성분으로 하는 심장순환계 질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디터페노이드계 화합물은 저밀도 지질 단백질에 대한 항산화 활성이 우수할 뿐만 아니라 ACAT에 대한 활성을 효과적으로 억제한다.

따라서, 본 발명의 조성물은 콜레스테롤 에스테르의 합성 및 축적으로 유발되는 고지혈증 및 동맥경화증과 같은 심장순환계 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

【명세서】

【발명의 명칭】

비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디테페노이드계 화합물을 유효성분으로 하는 심장순환계 질환의 예방 및 치료용 조성물{Composition comprising extract of Torreya nucifera or abietane diterpenoid compounds isolated from them for prevention and treatment of cardiovascular disease}

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<1> 본 발명은 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디테페노이드계 화합물을 유효성분으로 하는 심장순환계 질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

<2> 최근 성인병 증가와 아울러 동맥경화증 등 혈관장애질환이 크게 증가되고 있다. 동맥경화는 뇌동맥 또는 관상동맥에서 일어나기 쉬운데, 뇌동맥경화증의 경우에는 두통, 현기증, 정신장애를 나타내고 뇌연화증의 원인이 되며, 관상동맥경화증의 경우에는 심장부에 동통과 부정맥을 일으켜 협심증, 심근경색 등의 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 또한 이로 인해 고혈압, 심장병, 뇌일혈 등이 유발되어, 동맥경화증으로 인한 질병이 현대 사회에 있어, 특히 50~60대의 남성들에게 가장 큰 사망요인으로 부각되고 있다.

<3> 혈중 콜레스테롤 농도가 높으면 관상동맥성 심혈관 질환이 유발되기 쉬우므로, 혈중 콜레스테롤 농도를 줄이기 위해서는 콜레스테롤 및 지방의 섭취를 줄이는 식이요법을 시행하거나 지질대사와 관련된 효소를 저해함으로써 콜레스테롤의 흡수를 억제해야 한다.

<4> 따라서, 이러한 질병을 예방하려는 목적으로 종전부터 콜레스테롤 흡수의 억제와 생합성의 저해를 통한 혈장 저밀도 지질 단백질(low-density lipoprotein; LDL)량을 감소시키려는 시도가 진행되어 왔다 (Principles in Biochemistry, lipid biosynthesis, 770-817, 3rd Edition, 2000 Worth Publishers, New York; Steinberg, N. Engl. J. Med., 1989, 320, 915-924).

<5> 최근에는 죽상경화증(atherosclerosis)의 요인으로 혈액내 LDL 산화물의 생성이 주요관심의 대상이 되고 있으며(Circulation, 1995, 91, 2488-2496; Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 1997, 17, 3338-3346), 특히 LDL의 과도산화와 구조변형을 통해 생성된 HM-LDL(highly modified LDL)의 대식세포(macrophage)로의 유입에 따른 거품세포(foam cell) 생성이 밝혀짐에 따라 LDL 퍼옥사이드의 생성요인과 제거에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(Curr. Atheroscler. Res., 2000, 2, 363-372).

<6> 혈관벽내에 플라그(plaque) 형성과 파열은 심근경색 발병에 주요한 요인이며, 동맥경화는 혈관벽의 손상에 대한 만성 염증과정으로, 손상기작보다는 오히려 방어기작으로 제시되고 있다(Circ. Res. 2001, 89, 298-304).

<7> 아실 코에이:콜레스테롤 전이효소(acyl-CoA:cholesterol acyltransferase;

ACAT)는 일반적으로 콜레스테롤을 에스테르화 하는 효소로서, 그 작용 기작은 크게 체내의 세 부위(장, 간, 그리고 혈관벽 세포)에서 일어난다.

<8> 첫째, 장에서 ACAT는 섭취된 콜레스테롤을 에스테르의 형태로 바꾸어 장내로 흡수되는 것을 촉진시킨다. 둘째, 외부로부터 흡수되거나 체내에서 생합성된 콜레스테롤은 간에서 VLDL(very low-density lipoprotein)이라는 운반체 안에 축적된 후 혈관을 통해 신체 각 기관으로 공급되는데, 이때 ACAT에 의하여 콜레스테롤이 콜레스테릴 에스테르 형태로 전환됨으로써 운반체 내에 콜레스테롤 축적이 가능하게 된다. 셋째, 동맥혈관벽을 이루는 세포내에서 ACAT는 콜레스테롤을 그의 에스테르 형태로 전환시켜 세포내에 콜레스테롤이 축적되는 것을 촉진시키는데, 이는 동맥경화를 일으키는 직접적인 원인이 된다.

<9> 또한, ACAT 활성화에 의해 거품세포가 콜레스테롤로부터 유도된 다량의 콜레스테릴 에스테르를 포함하기 때문에, 실험적, 임상적인 측면에서 대식세포와 평활근 세포로부터 유도된 거품세포의 형성은 매우 중요하다. 혈관벽내의 거품세포의 증식은 ACAT 활성화 증가와 직접적으로 연관되어 있기 때문에 강력한 항동맥경화제로써 ACAT 저해제의 개발은 바람직하다.

<10> 따라서, ACAT의 활성을 억제하는 약물은 첫째, 장내 콜레스테롤의 흡수를 억제하여 체내로 유입되는 콜레스테롤의 양을 감소시킬 수 있을 것이며, 둘째, 간에서 혈관내로 콜레스테롤이 방출되는 것을 억제하여 혈중 콜레스테롤 농도를 떨어뜨릴 수 있고, 셋째, 혈관벽 세포에 콜레스테롤이 축적되는 것을 방지하여 직접적으로 동맥경화를 예방할 수 있을 것으로 기대된다.

- <11> 지금까지 보고된 ACAT 활성 저해제는 쥐간 마이크로솜 ACAT 또는 쥐간 대식 세포(J774) ACAT에 대한 활성 저해제이다.
- <12> 사람의 ACAT는 사람 ACAT-1 및 사람 ACAT-2가 있는데, 사람 ACAT-1(50 kDa)은 성인의 간, 부신, 대식세포, 신장에서 주로 작용하며, 사람 ACAT-2(46 kDa)는 소장에서 작용한다(Rudel, L. L. et al., Curr. Opin. Lipidol 12, 121-127, 2001). 사람 ACAT 활성을 저해하는 물질은 음식으로부터 유입되는 콜레스테롤의 흡수를 억제하고, 혈관내벽에 콜레스테릴 에스테르의 축적을 억제하는 기작을 통해 고콜레스테롤증, 콜레스테롤 결석 또는 동맥경화 예방 및 치료제의 표적이 되고 있다(Buhman, K. K. et al., Nature Medicine 6, 1341-1347, 2000).
- <13> 현재 고지혈증 치료제로 사용되고 있는 프로부콜(Probucol), N,N'-디페닐렌디아민(N,N'-diphenylenediamine), 페놀계 합성 항산화제인 BHA(butylatedhydroxyanisol)와 BHT(butylated hydroxy toluene)는 LDL 콜레스테롤을 감소시키고, 산화정도를 약화시키며 병변형성을 감소시켜 항산화력은 우수하나, 부작용이 많아 사용이 제한되고 있다.
- <14> 따라서, 고지혈증이나 동맥경화 환자에 있어서 LDL 항산화제와 함께 지질강하제의 병행투여 요법에 대한 관심도가 높아지고 있다.
- <15> 한편, 비자(榲桲, *Torreya nucifera*)는 주목과(Taxaceae)에 속하는 상록 침엽교목으로 전세계적으로 우리 나라와 일본에만 제한되어 분포한다. 비자나무는 식용, 관상용, 공업용, 약용으로 쓰이고, 종자는 먹거나 기름을 짜내서 이용한다. 또한, 한방과 민간에서는 과실을 구충, 발모, 건위, 조경, 장출혈 등에 약재로 이용

하고, 목재는 건축재, 기구재, 선박용재 등에 사용한다(김태정, 한국의 자원식물 I, p40, 서울대학교 출판부, 1996; 육창수, 아세아 생약도감, p23, 도서출판 경원, 1997). 비자나무의 잎과 종자에서 분리·보고된 성분으로는 세스퀴테르페노이드 (sesquiterpenoids, Sakai, T. et al., *Bull. Chem. Soc. Japan*, 38:381, 1965), 라브단(labdane) 계열과 아비에탄(abietane) 계열 디테르페노이드 (diterpenoids, Sayama, Y. et al, *Agric. Bio. Chem.*, 35:1068, 1971; Harrison, L. and Asakawa, Y., *Phytochemistry*, 26:1211, 1987), 그리고 플라보노이드 (flavonoids, Kariyone, T. and Sawaka, T., *Ykugaku Zasshi*, 78:1010, 1958) 등이 있다.

<16> 이에, 본 발명자들은 부작용이 적은 새로운 고지혈증, 동맥경화증 치료제를 천연물에서 탐색하던 중, 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디테르페노이드계 화합물에서 저밀도 지질 단백질에 대한 항산화 활성 및 ACAT 효소에 대한 우수한 저해 활성이 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<17> 본 발명은 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디테르페노이드계 화합물을 유효성분으로 하는 심장순환계 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공하고 자 한다.

【발명의 구성】

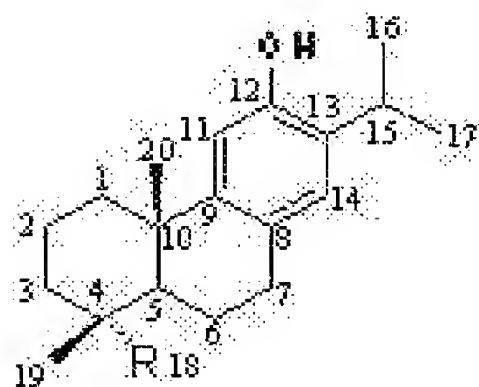
<18> 본 발명은 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디터페노이드계 화합물을 유효성분으로 하는 심장순환계 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

<19> 본 발명의 조성물은 심혈관계 질환의 예방 및 치료에 유용한 약학 조성물 및 건강식품 조성물을 포함한다.

<20> 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

<21> 본 발명은 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 하기 화학식 1로 표시되는 아비에탄 디터페노이드계 화합물을 유효성분으로 하는 심장순환계 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

【화학식 1】



<23> (R은 메틸, 하이드록시메틸 및 알데하이드 이다.)

<24> 상기 화학식 1의 아비에탄 디터페노이드계 화합물은 페루지놀(ferruginol, R = 메틸), 18-하이드록시페루지놀(18-hydroxyferruginol, R = 하이드록시메틸) 및

18-옥소페루지놀(18-oxoferruginol, R = 알데하이드)이고, 약학적으로 허용되는 염의 형태로 사용될 수 있으며, 통상의 방법에 의해 제조되는 모든 염, 수화물 및 용매화물이 포함된다.

<25> 본 발명에서 사용되는 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디터페노이드계 화합물은 통상적인 모든 방법에 의해 얻을 수 있고, 시판되는 시약을 사용할 수 있다.

<26> 본 발명에 따른 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디터페노이드계 화합물의 추출, 분리 및 정제방법은 다음과 같다.

<27> 건조된 비자나무 잎을 메탄올에 3주동안 방치하고 여과한 다음, 여과액에 착콜을 넣고 12시간동안 실온에서 교반한다. 이 용액을 여과하고 농축한 후, 여기에 물을 넣어 현탁시키고 한번 더 여과한다. 상기에서 얻은 상층을 에틸아세테이트로 녹이고, 농축하여 노란색의 유성물질을 얻는다. 상기에서 얻은 농축액을 디클로로메탄에 녹인 후, n-헥산을 천천히 가하여 재결정을 한 다음 필터글래스를 이용하여 여과하고, 액상을 농축하여 유성물질을 얻는다.

<28> 이때, 얻은 오일분획을 저밀도 지질 단백질에 대한 항산화 활성 및 사람 아실코에이:콜레스테롤 전이효소 1과 2에 대한 억제능을 측정한 결과, 이중성 저해효과를 나타낸다.

<29> 상기에서 얻은 오일분획을 에틸아세테이트와 n-헥산의 혼합용매를 이동상으로 하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 분리한다. 이때, 이동상 용매는 에틸아세테이트 : n-헥산 = 10~20 : 90~80 (v/v) 용매를 사용하는 것이 바람직하다.

- <30> 상기와 같은 방법에 의하여, 건조된 비자나무 잎 1kg당 순수 활성물질인 페루지놀(R = 메틸, 22mg), 18-하이드록시페루지놀(R = 하이드록시메틸, 307mg) 및 18-옥소페루지놀(R = 알데하이드, 62mg)을 얻는다.
- <31> 본 발명의 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디터페노이드계 화합물은 IC₅₀ 값이 낮게 나와 저밀도 지질 단백질에 대하여 우수한 항산화 활성을 나타낸다.
- <32> 또한, 본 발명의 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디터페노이드계 화합물은 hACAT-1 및 hACAT-2에서 ACAT에 대한 활성을 효과적으로 억제한다.
- <33> 따라서, 본 발명의 조성물은 콜레스테릴 에스테르의 합성 및 축적으로 유발되는 고지혈증 및 동맥경화증과 같은 심장순환계 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용할 수 있다.
- <34> 본 발명의 조성물은 상기 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디터페노이드계 화합물에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- <35> 본 발명의 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할

수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

<36> 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 비경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 일일 투여량은 비자나무 추출물일 경우 10~2,000 mg/kg 이며, 바람직하게는 50~500mg/kg 이다. 또한, 아비에탄 디터페노이드계 화합물일 경우 약 0.1~100mg/kg 이고, 바람직하게는 0.5~10mg/kg 이며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 더욱 바람직하다.

<37> 본 발명의 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디터페노이드계 화합물을 마우스에 경구 투여하여 독성 실험을 수행한 결과, 경구 투여 독성시험에 의한 50% 치사량(LD₅₀)은 적어도 1,000mg/kg 이상인 안전한 물질로 판단된다.

<38> 본 발명의 조성물은 심장순환계 질환의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과

병용하여 사용할 수 있다.

<39>

본 발명의 조성물은 심장순환계 질환의 개선을 목적으로 건강식품에 첨가될 수 있다. 본 발명의 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디터페노이드계 화합물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디터페노이드계 화합물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에는 본 발명의 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디터페노이드계 화합물은 원료에 대하여 1~20 중량%, 바람직하게는 5~10 중량%의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

<40>

상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

<41>

본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도

당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100ml당 일반적으로 약 0.01~0.04g, 바람직하게는 약 0.02~0.03g 이다.

<42> 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01~0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

<43> 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

<44> **실시예 : 비자나무로부터 아비에탄 디터페노이드계 화합물의 추출, 분리 및 정제**

<45> 1. 비자나무로부터 추출, 분리 및 정제

<46> 대한민국 제주도에서 구입한 비자나무 잎 1kg을 세척하여 건조시켰다. 건조된 비자나무 잎을 95% 메탄올 4ℓ에 넣어 상온에서 3주동안 방치하고 여과지로 여과한 다음, 여액에 착콜을 넣고 실온에서 12시간동안 교반하였다. 이 용액을 여과하고 감압하에서 농축하여 노란색의 유성물질을 얻었다. 여기에 물 200mℓ를 넣어 현탁시키고, 여과지를 이용하여 여과하였다. 상기에서 얻은 상층을 에틸아세테이트로 녹이고, 농축하여 노란색의 유성물질 40g을 얻었다. 상기에서 얻은 농축액을 디클로로메탄에 녹인 후, n-헥산을 천천히 가하여 재결정을 한 다음 필터글래스를 이용하여 여과하고, 액상을 농축하여 30g의 유성물질을 얻었다.

<47> 이때, 얻은 오일분획을 저밀도 지질 단백질에 대한 항산화 활성 및 사람 아실코에이:콜레스테롤 전이효소 1과 2에 대한 억제능을 측정한 결과, 이중성 저해효과를 나타낸다.

<48> 상기에서 얻은 오일분획 30g을 에틸아세테이트와 n-헥산의 혼합용매를 이동상으로 하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(실리카겔 : Merk, Art 9385, 컬럼크기 : $\phi 7 \times 40\text{cm}$)로 분리하였다. 이때, 이동상 용매는 에틸아세테이트 : n-헥산 = 1:9 (v/v) 용매를 사용한 경우 활성물질이 가장 효과적으로 분리되었으며, 이 때 순수 활성물질인 페루지놀(R = 메틸, 22mg), 18-하이드록시페루지놀(R = 하이드록시메틸, 307mg) 및 18-옥소페루지놀(R = 알데하이드, 62mg)을 얻었다.

<49> 또한 얻은 무색 고체의 화합물 18-하이드록시페루지놀(R = 하이드록시메틸) 100mg을 디클로로메탄 5mℓ에 녹이고 n-헥산 10mℓ를 천천히 가하였다. 이때, 디에틸

에테르 1ml를 넣고, 24시간동안 실온에서 방치하였다. 이렇게 얻은 단결정은 X-선 결정분석법을 이용하여 18-하이드록시페루지놀의 입체화학을 결정할 수 있었다.

<50> 2. 아비에탄 디터페노이드계 화합물의 구조 분석

<51> 상기 1에서 얻은 물질은, VG 고분해능 GC/MS 분광기(VG high resolution GC/MS spectrometer, Election Ionization MS, Autospec-Ultima)를 사용하여 분자량 및 분자식을 결정하였으며, 선광도는 편광기(Jasco DIP-181 digital polarimeter)를 사용하여 측정하였다. 또한 핵자기공명(NMR) 분석(Bruker AMX 300, 500)을 통하여 ^1H NMR, ^{13}C NMR, 호모-코지(HOMO-COSY), HMQC(^1H -Detected heteronuclear Multiple-Quantum Coherence), HMBC(Heteronuclear Multiple-Bond Coherence), DEPT(Distortionless Enhancement by Polarization) 스펙트럼을 얻고, 분자구조를 결정하였다.

<52> 측정 결과는 하기와 같으며, 발표된 문헌의 것과 비교 분석한 결과, 화학식 1의 화합물은 페루지놀(R = 메틸), 18-하이드록시페루지놀(R = 하이드록시메틸) 및 18-옥소페루지놀(R = 알데하이드)[L. J. Harrison and Y. Asakawa, *Pytochemistry*, 1987, 26, 1211]로 확인하였다.

<53> [페루지놀]

<54> 1) 물성 : 무색 오일

<55> 2) 선광도 : $[\alpha]_D^{25+} 56.6^\circ$ (c=0.6, CHCl₃)

<56> 3) 분자량 : 286

<57> 4) 분자식 : C₂₀H₃₀O

<58> 5) ¹H-NMR(CDCl₃, 300MHz) δ 0.90(s, 3H, H-18), 0.93(s, 3H, H-19), 1.16(s, 3H, H-20), 1.21(d, J = 5.1Hz, 3H, H-16), 1.23(d, J = 5.1Hz, 3H, H-17), 1.20(dd, J = 3.0, 10.4Hz, 1H), 1.22(t like, J = 5.1Hz, 6H, H-18, 19), 1.31(dd, J = 1.7, 9.3Hz, 1H), 1.38(dd, J = 2.8, 10.4Hz, 1H), 1.58-1.89(m, 3H), 1.84(m, 1H), 2.15(dd like, J = 0.7, 8.7Hz, 1H), 2.76(ddd, J = 1.3, 5.3, 8.5Hz, 1H, H-7a), 2.85(ddd, J = 1.3, 5.2, 8.6Hz, 1H, H-7b), 3.10(m, 1H, H-15), 4.49(br, 1H, -OH), 6.62(s, 1H, H-13), 6.82(s, 1H, H-10).

<59> 6) ¹³C-NMR(CDCl₃, 75MHz) δ 19.2(C-2), 19.3(C-6), 21.6(C-19), 22.5(C-16), 22.7(C-17), 24.8(C-20), 26.8(C-15), 29.7(C-7), 33.3(C-18), 33.4(C-4), 37.5(C-10), 38.8(C-1), 41.7(C-3), 50.3(C-5), 110.9(C-11), 126.6(C-14), 127.3(C-8), 131.3(C-13), 148.7(C-9), 150.6(C-12).

<60> 7) EIMS(rel. int.) m/z [M]⁺ 69(78.4), (64.5), 159.1(47.5), 175.1(90.7), 187.1(63.8), 201.1(86.0), 215.1(54.4), 229.2(56.5), 271.2(100), 286.2 (99.6).

<61> [18-하이드록시페루지놀]

<62> 1) 물성 : 무색 프리즘, 녹는점(M.P.) = 185~187°C

<63> 2) 선광도 : $[\alpha]_D^{25+} 110^\circ$ (c=0.2, CHCl₃)

<64> 3) 분자량 : 302

<65> 4) 분자식 : C₂₀H₃₀O₂

<66> 5) ¹H-NMR(MeOD, 500MHz) δ 0.84(s, 3H, H-19), 1.16(t like, J = 5.7Hz, 6H, H-16, 17), 1.18(s, 3H, H-20), 1.31(m, 2H, H-3), 1.51(dt, J = 3.9, 13.4Hz, 1H, H-2a), 1.65(m, 3H, H-6, H-2b), 1.79(m, 2H, H-1), 2.20(d like, J = 12.7Hz, 1H, H-5), 2.75(d like, J = 7.7Hz, 2H, H-7), 3.09(d, J = 11.0Hz, 1H, H-18a), 3.22(m, 1H, H-15), 3.30(s, 1H, -OH), 3.41(d, J = 11.0Hz, 1H, H-18b), 6.63(s, 1H, H-11), 6.78(s, 1H, H-14).

<67> 6) ¹³C-NMR(MeOD, 125MHz) δ 18.0(C-19), 19.8(C-2), 20.1(C-6), 23.2(C-16, 17), 25.8(C-20), 27.7(C-15), 30.4(C-7), 36.3(C-3), 38.4(C-4), 38.9(C-10), 39.9(C-1), 45.0(C-5), 72.0(C-18), 111.6(C-11), 126.9(C-14), 127.2(C-8), 133.2(C-13), 149.1(C-9), 153.1(C-12).

<68> 7) EIMS(rel. int.) m/z [M]⁺ 147(46.5), 175(70.2), 189(78.0), 201(45.0), 227(50.7), 269(100.0), 287(60.0), 302(95.1).

<69> **[18-옥소페루지놀]**

<70> 1) 물성 : 무색 프리즘, 녹는점(M.P.) = 140~142℃

<71> 2) 선광도 : $[\alpha]_D^{25+} 61^\circ$ (c=0.2, CHCl₃)

<72> 3) 분자량 : 300

<73> 4) 분자식 : C₂₀H₂₈O₂

<74> 5) ¹H-NMR(CDCl₃, 300MHz) δ 1.13(s, 3H, H-19), 1.21(s, 3H, H-20), 1.22

(d, J = 4.23Hz, 6H, 3H-16,17), 1.28(m, 2H), 1.44(m, 3H), 1.79(m, 3H), 2.22(m, 1H), 2.79(m, 2H, H-7), 3.09(m, 1H, H-15), 4.52(s, 1H, C12-OH), 6.62(s, 1H, H-11), 6.82(s, 1H, H-14), 9.24(s, 1H, -CHO).

<75> 6) ¹³C-NMR(CDCl₃, 75MHz) δ 14.0(C-19), 17.8(C-2), 21.5(C-6), 22.5(C-16),

22.7(C-17), 25.0(C-20), 26.8(C-15), 29.0(C-7), 32.0(C-3), 36.2(C-10), 37.8(C-1), 42.8(C-5), 49.8(C-4), 110.8(C-11), 126.7(C-8), 126.9(C-14), 132.0(C-13), 147.2(C-9), 150.9(C-12), 206.4(C-18).

<76> **실험예 1 : TBARS법에 의한 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄**

디터페노이드계 화합물의 항산화 활성

<77> 본 발명의 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디터페노이드계

화합물의 저밀도 지질 단백질에 대한 항산화 활성을 알아보기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

<78> Cu^{2+} 은 저밀도 지질 단백질의 산화를 유도(Cu^{2+} mediated LDL-oxidation)하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 발명에서는 이 때 생성된 불포화 지방산의 산화산물인 디알데하이드(dialdehyde)를 TBA(thiobarbituric acid) 방법으로 측정하여, 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디터페노이드계 화합물의 항산화 활성을 조사하였다(Packer, L. Ed. (1994) *Methods in Enzymology* Vol. 234, Oxygen radicals in biological systems Part D. Academic press, San Diego).

<79> 사람의 혈장 300ml를 초원심분리기로 100,000 xg에서 24시간동안 원심분리하여 상층에 부유된 고밀도 지질단백질(VLDL)/킬로마이크론(chylomicron)층을 제거하고 나머지 용액의 비중을 1.063 g/ml로 맞춘 후, 100,000 xg에서 24시간동안 원심분리하여 다시 상층에 부유된 저밀도 지질 단백질 25ml(1.5~2.5mg 단백질/ml)를 분리하였다.

<80> 이렇게 분리한 저밀도 지질 단백질 20 μl (단백질 농도, 50-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 10mM 인산완충용액(phosphate-buffered saline, PBS) 210 μl 와 혼합하고, 상기 실시예에서 제조한 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디터페노이드계 화합물의 용액을 각각 10 μl 씩 첨가하였다.

<81> 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디터페노이드계 화합물은 DMSO(dimethylsulfoxide)에 녹여 사용하였으며, 실험에 사용하기 전에 여러 농도로

회석하였다. 음성 대조군으로는 용매만을 첨가한 것을 사용하였으며, 양성 대조군으로는 프로부콜(probuco1)을 첨가한 것을 사용하였다.

<82> 상기 용액에 0.25mM CuSO₄ 10 μ l를 첨가하여 37℃에서 4시간동안 반응시키고, 20% 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid, TCA) 용액 1ml를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 0.05N NaOH 용액에 녹인 0.67% TBA 용액 1ml를 첨가하고 10초간 교반시킨 후 95℃에서 5분동안 가열하여 발색 반응이 일어나도록 하고 얼음물로 용액을 냉각하였다. 이 용액을 3000rpm에서 5분동안 원심분리하여 상등액을 분리하였으며, 자외선-가시광선 분광기로 540nm에서의 흡광도를 측정하여 상기 발색 반응으로 생성된 말론디알데하이드(malondialdehyde, MDA)의 양을 구하였다.

<83> 한편, 테트라메톡시프로판(말론알데하이드 비스(디메틸아세탈)) [tetramethoxypropane malonaldehyde bis(dimethylacetal)]의 저장용액을 이용하여 0~10 nmol 말론디알데하이드를 포함하는 PBS 표준용액을 250 μ l씩 만들었다.

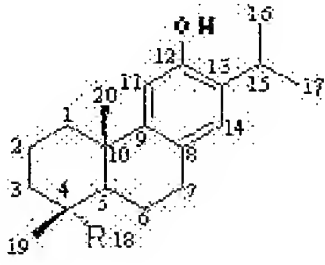
<84> 이 표준용액을 상기와 같은 방법으로 발색시켜 540nm에서의 흡광도를 측정하고, 말론디알데하이드의 표준곡선을 구하였다.

<85> 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디터페노이드계 화합물을 사용한 상기 실험에서 말론디알데하이드의 양은 이 표준곡선을 이용하여 정량하였다.

<86> 결과는 표 1에 나타내었다.

【표 1】

<87>

화합물		IC ₅₀ (μ M)
비자나무 추출물 (4 μ g/ml)		71% 억제
	R=메틸	1.90
	R=하이드록시메틸	0.43
	R=알데하이드	0.92
양성대조군 (프로부콜)		1.55

<88> 표 1에 나타난 바와 같이, 본 발명의 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디터페노이드계 화합물의 IC₅₀ 값이 낮게 나와 저밀도 지질단백질에 대한 항산화 활성이 우수함을 알 수 있다.

<89> 따라서, 본 발명에 의한 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디터페노이드계 화합물은 저밀도 지질 단백질이 산화되어 유발되는 것으로 알려진 고지혈증 및 동맥경화증과 같은 심장순환계 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

<90> **실험예 2 : 본 발명의 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디터페노이드계 화합물의 ACAT 활성에 미치는 영향**

<91> 본 발명의 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디터페노이드계 화합물의 ACAT 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

<92> **1. ACAT 효소원의 제조**

<93> 사람 ACAT-1 및 ACAT-2의 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 벡로로바이러스 발현체제를 이용하여 사람 ACAT-1과 ACAT-2 단백질을 얻었다.

<94> 사람 간 cDNA library screening을 통하여 얻어진 hACAT-1과 hACAT-2의 cDNA를 벡로로바이러스 전달 벡터에 삽입하고, 곤충세포인 sf9 세포에 도입하여 바이러스를 제조하였다. 그 후, 플라크 정제(plaque purification) 방법으로 hACAT-1과 hACAT-2의 재조합 바이러스를 분리한 후 3 차례의 증폭과정을 거쳐 viral stock의 titer를 높였다. 단백질 발현효율이 좋은 Hi5 곤충세포에 재조합 바이러스를 감염 다중도(Multiplicity of Infection)가 1이 되도록 감염시킨 후 27℃에서 하루 동안 진탕배양하였다.

<95> 배양된 hACAT-1과 hACAT-2는 각각 과량 발현된 Hi5 세포들로부터 마이크로솜 분획을 분리하기 위하여, 500xg에서 15분간 원심분리하여 세포들을 모으고 저장완충액(hypotonic buffer)에서 급냉동 급해동 방법으로 세포를 깬 후 100,000 xg에서 한시간동안 초원심분리하였다.

<96> 얻어진 마이크로솜 분획들은 단백질 농도가 8mg/ml이 되도록 저장완충액으로 현탁하여 사용 전까지 저온냉동기에 보관하였다.

<97> **2. ACAT 활성 측정**

<98> 아세톤에 1mg/ml의 농도로 용해된 콜레스테롤 용액 6.67 μ l를, 아세톤중의

10% 트리톤(triton) WR-1339(Sigma Co.) 6 μ l와 혼합하고, 질소가스를 이용하여 아세톤을 증발시켜 제거하였다. 얻어진 혼합물에 증류수를 가하여 콜레스테롤의 농도가 30mg/ml가 되도록 조절하였다.

<99> 10 μ l의 콜레스테롤 수용액에, 10 μ l의 1M KH₂PO₄(pH 7.4), 5 μ l의 0.6mM 우혈청 알부민(BSA; bovine serum albumin), 상기 1에서 얻은 10 μ l의 마이크로솜 용액, 10 μ l의 시료(비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디터페노이드계 화합물) 및 45 μ l의 증류수를 가하였다(총 90 μ l). 혼합물을 37°C 수욕에서 30분동안 예비 반응시켰다.

<100> 10 μ l의 (1-¹⁴C)올레일-CoA 용액(0.05 μ Ci, 최종 농도 : 10 μ M)을 예비 반응된 혼합물에 가하고, 생성된 혼합물을 37°C 수욕에서 30분동안 반응시켰다. 여기에 500 μ l의 이소프로판올:헵탄 혼합물(4:1(v/v)), 300 μ l의 헵탄 및 200 μ l의 0.1 M KH₂PO₄(pH 7.4)을 가하고, 혼합물을 볼텍스(vortex)로 격렬하게 혼합한 후, 상온에서 2분동안 방치하였다.

<101> 생성된 200 μ l의 상층액을 신틸레이션 병에 넣고, 신틸레이션 액(Lumac) 4ml을 가하였다. 이 혼합물의 방사선량은 1450 마이크로베타 액체 신틸레이션 계수기(1450 Microbeta liquid scintillation counter, Wallacoy, Finland)로 측정하였다.

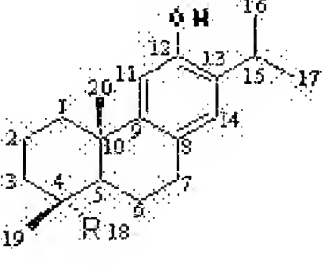
<102> ACAT 활성은 측정된 방사선량으로부터 시간당 방사선량을 계산하여 1분동안 단백질 1mg 당 합성된 콜레스테릴 올레이트 피코몰(피코몰/분/mg 단백질)로 계산하

<102> 였다.

<103> 결과는 표 2에 나타내었다.

【표 2】

<104>

화합물		IC ₅₀ (μ M)	
		hACAT-1	hACAT-2
비자나무 추출물 (100 μg/ml)		81% 억제	77% 억제
	R=메틸	45.7	88.1
	R=하이드록시메틸	169.0	156.0
	R=알데하이드	52.5	61.2

<105> 표 2에 나타난 바와 같이, 본 발명의 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디테르페노이드계 화합물은 hACAT-1 및 hACAT-2에서 아실-코에이:콜레스테롤 전이효소에 대한 저해 활성이 매우 우수함을 알 수 있다.

<106> 따라서, 본 발명에 의한 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디테르페노이드계 화합물은 콜레스테릴 에스테르의 합성 및 축적으로 유발되는 고지혈증 및 동맥경화증과 같은 심장순환계 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

<107> **실험예 3 : 본 발명의 비자나무 추출물에 의한 혈중콜레스테롤 강하효과**

<108> 본 발명의 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디테르페노이드계

화합물의 혈중콜레스테롤 강하효과를 알아보기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

<109> 6주령의 특정 병원체 부재(specific pathogens free) C57BL/6J 마우스로서 숫컷 30마리를 온도 $22\pm3^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm10\%$, 조명 12L/12D의 동물실내에서 사육하였다. 마우스는 실험에 사용되기 전 1주일 정도 순화시켰다. 7주령(체중: 20~22g)이 되었을 때, 난괴법(randomized block design)에 의해 5개의 군으로 나누었다. 1군의 쥐들에게는 고콜레스테롤/고지방식이(CRF-1; AIN-76 실험동물 정상식이에 1.25% 콜레스테롤과 15% 지방이 포함된 식이, Orient Yeast Co. Ltd., Japan)를, 2군의 쥐들에게는 고콜레스테롤/고지방식이에 1% 비자나무 메탄올 추출물을 함유하는 식이를, 3군의 쥐들에게는 고콜레스테롤/고지방식이에 0.1% 프로부콜을 함유하는 식이를 각각 섭취시켰다. 모든 식이군의 생쥐들에게 10일 동안 해당 식이를 물과 함께 자유로이 섭취하도록 하였으며, 식이 섭취량을 매일 기록하고 5일 간격으로 체중을 측정하였다. 동물사육이 종료된 후 사육 일지의 자료를 분석한 결과, 식이 섭취량과 체중증가에 있어서는 3개군 간 유의적인 차이가 없었으며 정상적인 성장을 보였다.

<110> 동물실험을 수행한지 10일 후, 3개군의 마우스를 희생시킨 다음 혈액을 분석하였다.

<111> 희생된 마우스의 레트로-오비탈 시너스(retro-orbital sinus)에서 헤파린 처리된 모세관으로 혈액을 채취하고, 이 혈액을 8,000 xg에서 10분간 원심분리하여 상층부의 혈장을 분리하여 초저온 냉동고에 보관하였다가 혈액 분석에 사용하였다.

<112> 총 콜레스테롤(TC)의 함량은 각 실험군의 혈청으로부터 혈액 화학 분석기 (CIBA Corning 550 Express, USA)를 사용하여 직접 측정하였다. 또한, HDL-콜레스테롤(HDL)의 경우는, 각 실험군의 혈청에 덱스트란 설페이트와 황산마그네슘을 첨가하여 LDL과 VLDL을 침전시킨 다음 상층액 내의 HDL을 측정하는 방법(문헌[① Stein E.A., et al,: Development and evaluation of a method for quantitation of plasma high-density-lipoprotein cholesterol. Clin. Chem. 24: 1112-1115, 1978; ② Finley P.R., et al,: Cholesterol in high-density lipoprotein: use of Mg²⁺/dextran sulfate in its enzymic measurement. Clin. Chem., 24: 931-933, 1978; ③ Warnick G.R., et al : Dextran sulfate-Mg²⁺ precipitation procedure for quantitation of high-density lipoprotein cholesterol. Clin. Chem. 28: 1379-1388, 1982]참조)을 응용하여 만들어진 HDL 측정용 시약(Chiron Diagnostics Co., USA)을 각 실험군의 혈장과 1:10의 비율로 혼합하고 20~25℃ 배양기 (incubator)에서 5분간 반응시킨 후 8,000 xg에서 10분간 원심분리하여 얻어진 상층액을 혈액 화학 분석기로 옮겨 측정하였다. 컴퓨터 통계 프로그램(마이크로소프트 엑셀, 버전 7.0)을 사용하여 각각의 마우스로부터 얻어진 혈액분석치들의 실험군간의 유의성 차이를 분석 및 검정(student t-test)하였다.

<113> 측정된 총 콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤의 농도는 표 3에 나타내었다.

【표 3】

<114>		고콜레스테롤/ 고지방식이군	(고콜레스테롤/고지방) +비자나무 추출물 식이군	(고콜레스테롤/고지방) +프로부콜 식이군
-------	--	-------------------	-------------------------------	---------------------------

총 콜레스테롤 (mg/dl)	207±28.5	148.8±28.5	177.0±33.7
HDL-콜레스테롤 (mg/dl)	54.1±6.0	39.2±6.0	41.7±6.4
HDL/총 콜레스테롤 (%)	26.4	26.9	24.3

<115> 표 3에 나타난 바와 같이, 본 발명의 비자나무 추출물 투여군에서는 대조군에 비해 혈중 총 콜레스테롤의 양이 28.4% 감소하였다. 한편, 양성대조군인 프로부콜은 대조군에 비해 총 콜레스테롤의 양이 14.8% 감소하였다.

<116> 그러나 비자나무 추출물과 양성대조군인 프로부콜의 혈중 HDL의 양은 대조군과 비슷하여, 상대적으로 혈중 LDL의 양을 감소시킴을 알 수 있다.

<117> 따라서, 본 발명의 비자나무 추출물은 혈청 LDL을 감소시킴과 동시에 혈중 콜레스테롤을 낮추어 줌으로써, 심장순환계 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

<118> **실험예 4 : 마우스에 대한 경구투여 급성 독성실험**

<119> 본 발명에 따른 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디터페노이드계 화합물의 급성 독성을 알아보기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

<120> 4주령의 특정 병원체 부재(specific pathogens free) ICR 마우스로서 암컷 12 마리와 수컷 12마리(암수 각각 3마리/용량군)를 온도 22±3℃, 습도 55±10%, 조명 12L/12D의 동물실내에서 사육하였다. 마우스는 실험에 사용되기 전 1주일 정

도 순화시켰다. 실험동물용 사료((주)제일제당, 마우스 및 랫트용) 및 음수는 멸균한 후 공급하였으며 자유섭취시켰다.

<121> 상기 실시예에서 제조한 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디터페노이드계 화합물을 0.5% 트윈 80을 용매로 하여 50mg/ml 농도로 조제한 후, 마우스 체중 20g 당 0.04ml(100mg/kg), 0.2ml(500mg/kg), 0.4ml(1,000mg/kg)씩 경구투여하였다. 시료는 단회 경구 투여하였으며, 투여 후 7일 동안 다음과 같이 부작용 또는 치사 여부를 관찰하였다. 즉, 투여당일은 투여 후 1시간, 4시간, 8시간, 12시간 뒤에, 그리고 투여 익일부터 7일째까지는 매일 오전, 오후 1회 이상씩 일반증상의 변화 및 사망동물의 유무를 관찰하였다.

<122> 또한, 투여 7일째에 동물을 치사시켜 해부한 후 육안으로 내부 장기를 검사하였다. 투여당일부터 1일 간격으로 체중의 변화를 측정하여 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디터페노이드계 화합물에 의한 동물의 체중 감소 현상을 관찰하였다.

<123> 시험 결과, 시험물질을 투여한 모든 마우스에서 특기할 만한 임상증상은 없었고 폐사된 마우스도 없었으며, 또한 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학 검사, 부검소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다.

<124> 따라서, 본 발명에 따른 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디터페노이드계 화합물은 모든 마우스에서 1,000mg/kg까지 독성변화를 나타내지 않았으며, 경구투여 최소치사량(LD₅₀)이 적어도 1,000mg/kg 이상인 안전한 물질로 판단

되었다.

<125> 하기에 본 발명의 조성물을 위한 제제예를 예시한다.

<126> **제제예 1 : 약학적 제제의 제조**

<127> 1. 산제의 제조

<128> 아비에탄 디터페노이드계 화합물 2g

<129> 유당 1g

<130> 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

<131> 2. 정제의 제조

<132> 아비에탄 디터페노이드계 화합물 100mg

<133> 옥수수전분 100mg

<134> 유 당 100mg

<135> 스테아린산 마그네슘 2mg

<136> 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

<137> 3. 캡슐제의 제조

<138> 아비에탄 디터페노이드계 화합물 100mg

- <139> 옥수수전분 100mg
- <140> 유 당 100mg
- <141> 스테아린산 마그네슘 2mg
- <142> 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

- <143> 4. 주사액제의 제조
- <144> 아비에탄 디터페노이드계 화합물 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- <145> 묽은 염산 BP pH 3.5로 될 때까지
- <146> 주사용 염화나트륨 BP 최대 1ml
- <147> 적당한 용적의 주사용 염화나트륨 BP 중에 아비에탄 디터페노이드계 화합물을 용해시키고, 생성된 용액의 pH를 묽은 염산 BP를 사용하여 pH 3.5로 조절하고, 주사용 염화나트륨 BP를 사용하여 용적을 조절하고 충분히 혼합하였다. 용액을 투명유리로 된 5ml 타입 I 앰플 중에 충전시키고, 유리를 용해시킴으로써 공기의 상부 격자하에 봉입시키고, 120℃에서 15분 이상 오토클레이브시켜 살균하여 주사액제를 제조하였다.

- <148> **제제예 2 : 식품의 제조**
- <149> 아비에탄 디터페노이드계 화합물을 포함하는 식품들을 다음과 같이 제조하였

다.

<150> 1. 조리용 양념의 제조

<151> 아비에탄 디터페노이드계 화합물 0.2 ~ 10 중량%로 건강 증진용 조리용 양념을 제조하였다.

<152> 2. 토마토 케찹 및 소스의 제조

<153> 아비에탄 디터페노이드계 화합물 0.2 ~ 1.0 중량%를 토마토 케찹 또는 소스에 첨가하여 건강 증진용 토마토 케찹 또는 소스를 제조하였다.

<154> 3. 밀가루 식품의 제조

<155> 아비에탄 디터페노이드계 화합물 0.1 ~ 5.0 중량%를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

<156> 4. 스프 및 육즙(gravies)의 제조

<157> 아비에탄 디터페노이드계 화합물 0.1 ~ 1.0 중량%를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

<158> 5. 그라운드 비프(ground beef)의 제조

<159> 아비에탄 디터페노이드계 화합물 10 중량%를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.

<160> 6. 유제품(dairy products)의 제조

<161> 아비에탄 디터페노이드계 화합물 0.1 ~ 1.0 중량%를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

<162> 7. 선식의 제조

<163> 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60메쉬의 분말로 제조하였다.

<164> 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60메쉬의 분말로 제조하였다.

<165> 아비에탄 디터페노이드계 화합물을 진공 농축기에서 감압·농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

<166> 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 아비에탄 디터페노이드계 화합물의 건조분말을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

<167> 곡물류(현미 30중량%, 율무 15중량%, 보리 20중량%),

- <168> 종실류(들깨 7중량%, 검정콩 8중량%, 검정깨 7중량%),
- <169> 아비에탄 디터페노이드계 화합물의 건조분말(1 중량%),
- <170> 영지(0.5중량%),
- <171> 지황(0.5중량%)

<172> **제제예 3 : 음료의 제조**

<173> 1. 탄산음료의 제조

<174> 설탕 5~10%, 구연산 0.05~0.3%, 카라멜 0.005~0.02%, 비타민 C 0.1~1%의 첨가물을 혼합하고, 여기에 79~94%의 정제수를 섞어서 시럽을 만들고, 상기 시럽을 85~98℃에서 20~180초간 살균하여 냉각수와 1:4의 비율로 혼합한 다음 탄산가스를 0.5~0.82% 주입하여 아비에탄 디터페노이드계 화합물을 함유하는 탄산음료를 제조하였다.

<175> 2. 건강음료의 제조

<176> 액상과당(0.5%), 올리고당(2%), 설탕(2%), 식염(0.5%), 물(75%)과 같은 부재료와 아비에탄 디터페노이드계 화합물을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 건강음료를 제조하였다.

<177> 3. 야채쥬스의 제조

<178> 아비에탄 디터페노이드계 화합물 0.5g을 토마토 또는 당근 주스 1,000ml에
가하여 건강 증진용 야채주스를 제조하였다.

<179> 4. 과일주스의 제조

<180> 아비에탄 디터페노이드계 화합물 0.1g을 사과 또는 포도 주스 1,000ml에 가
하여 건강 증진용 과일주스를 제조하였다.

【발명의 효과】

<181> 본 발명의 비자나무 추출물 또는 그로부터 분리된 아비에탄 디터페노이드계
화합물은 저밀도 지질 단백질에 대한 항산화 활성이 우수할 뿐만 아니라 ACAT에 대
한 활성을 효과적으로 억제한다.

<182> 따라서, 본 발명의 조성물은 콜레스테릴 에스테르의 합성 및 축적으로 유발
되는 고지혈증 및 동맥경화증과 같은 심장순환계 질환의 예방 및 치료에 유용하게
사용할 수 있다.

【특허청구범위】

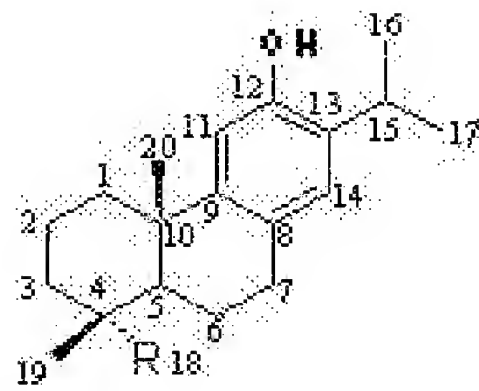
【청구항 1】

비자나무 추출물을 유효성분으로 하는 심장순환계 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

【청구항 2】

하기 화학식 1로 표시되는 아비에탄 디터페노이드계 화합물을 유효성분으로 하는 심장순환계 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

<화학식 1>



(R은 메틸, 하이드록시메틸 및 알데하이드 이다.)

【청구항 3】

제 2항에 있어서, 상기 아비에탄 디터페노이드계 화합물은 비자나무로부터 추출·분리·정제하여 얻은 것임을 특징으로 하는 심장순환계 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

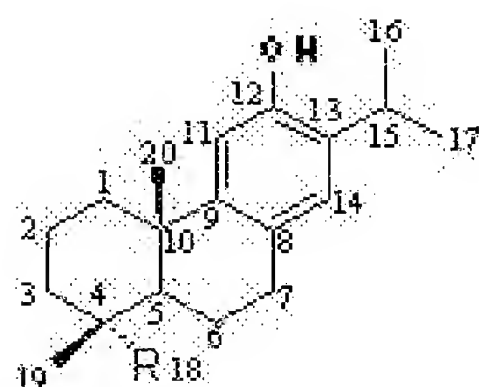
【청구항 4】

비자나무 추출물을 유효성분으로 하는 심장순환계 질환의 예방 및 치료용 식품 조성물.

【청구항 5】

하기 화학식 1로 표시되는 아비에탄 디터페노이드계 화합물을 유효성분으로 하는 심장순환계 질환의 예방 및 치료용 식품 조성물.

<화학식 1>



(R은 메틸, 하이드록시메틸 및 알데하이드 이다.)

【청구항 6】

제 5항에 있어서, 상기 아비에탄 디터페노이드계 화합물은 비자나무로부터 추출·분리·정제하여 얻은 것임을 특징으로 하는 심장순환계 질환의 예방 및 치료용 식품 조성물.